



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SAN LUIS POTOSÍ**

---

---

**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS  
PROGRAMA DE POSGRADO EN CIENCIAS  
FARMACOBIOLOGICAS**

**“ESTUDIO DE LA NEUROTOXICIDAD INDUCIDA POR  
METIL MERCURIO EN NEURONAS Y SU RELACION CON  
EL DESARROLLO DE ENFERMEDADES  
NEURODEGENERATIVAS”**

**TESIS PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRÍA EN  
CIENCIAS FARMACOBIOLOGICAS PRESENTA**

**ALVAREZ DOMÍNGUEZ ANGELA**

**DIRECTOR DE TESIS**

**DR. SERGIO ZARAZÚA GUZMÁN**

**CO-DIRECTOR DE TESIS**

**DRA. MARÍA GUADALUPE MARTEL GALLEGOS**

**San Luis Potosí, S.L.P.      Febrero 2024**



REPOSITORIO INSTITUCIONAL



**UASLP-Sistema de Bibliotecas  
Repositorio Institucional**

**Tesis digitales**

**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS**

**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en este Trabajo Terminal está protegido por la Ley Federal de Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos.

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde se obtuvo, mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto o con fines de lucro, reproducción, edición o modificación será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

**“ESTUDIO DE LA NEUROTOXICIDAD INDUCIDA POR METIL MERCURIO EN NEURONAS Y SU RELACION CON EL DESARROLLO DE ENFERMEDADES NEURODEGENERATIVAS” © 2023 by Angela Alvarez Dominguez is**

licensed under [Attribution-NonCommercial-NoDerivatives 4.0 International](#)

### **REALIZADO EN:**

Laboratorio de Biomédicas en la Unidad Académica Multidisciplinaria Zona Media  
Laboratorio de Neuro toxicología de la Facultad de Ciencias Químicas

Laboratorio de Electrofisiología de la Facultad de Medicina de la Universidad  
Autónoma de San Luis Potos

El programa de Maestría en Ciencias Farmacobiológicas de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí pertenece al Sistema Nacional de Posgrados de Calidad (SNP) del CONAHCYT registro (003382), Número de registro de la beca otorgada por CONAHCYT: (1007797), Nivel 1.

Los datos del trabajo titulado “Estudio De La Neurotoxicidad Inducida Por Metil Mercurio En Neuronas Y Su relación Con El Desarrollo De Enfermedades Neurodegenerativas” se encuentran bajo el resguardo de la Facultad De Ciencias Químicas, Programa De Posgrado En Ciencias Farmacobiológicas y pertenecen a la Universidad Autónoma de San Luis Potosí.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SAN LUIS POTOSÍ  
Facultad de Ciencias Químicas  
Centro de Investigación y Estudios de Posgrado  
Posgrado en Ciencias Farmacobiológicas  
Programa de Maestría

Formato M12

### Aprobación de Tema de Terminal

San Luis Potosí SLP a 23 / 01 /2024

#### Comité Académico

La presente es para que quede asentado que el tema de Tesis de maestría:

***Estudio de la Neurotoxicidad Inducida por Metilmercurio en Neuronas y su Relación con el Desarrollo de Enfermedades Neurodegenerativas***

De la estudiante: Ángela Álvarez Domínguez, que se llevará a cabo en el laboratorio de Neurotoxicología de la Facultad de Ciencias Químicas, es APROBADO.

Sin más por el momento, quedo de Uds.

**ATENTAMENTE**

---

**Dr. Sergio Zarazúa Guzmán**  
Coordinador Académico del Posgrado



---

---

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SAN LUIS POTOSÍ**

**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS  
PROGRAMA DE POSGRADO EN CIENCIAS FARMACOBIOLOGICAS**

**“ESTUDIO DE LA NEUROTOXICIDAD INDUCIDA POR METIL MERCURIO  
EN NEURONAS Y SU RELACION CON EL DESARROLLO DE  
ENFERMEDADES NEURODEGENERATIVAS”**

**TESIS PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRÍA EN CIENCIAS  
FARMACOBIOLOGICAS PRESENTA**

**ALVAREZ DOMÍNGUEZ ANGELA**

**SINODALES**

**PRESIDENTE: DR. SERGIO ZARAZÚA GUZMÁN** \_\_\_\_\_

**SECRETARIO: DRA. MA. GUADALUPE MARTEL GALLEGOS** \_\_\_\_\_

**VOCAL: DRA. ANA KAREN GONZÁLEZ PALOMO** \_\_\_\_\_

**VOCAL: DR. FRANCISCO JAVIER PÉREZ VÁZQUEZ** \_\_\_\_\_

**San Luis Potosí, S.L.P. FEBRERO 2024**

San Luis Potosí, S.L.P.

Febrero , 2024

## **INTEGRANTES DEL COMITÉ TUTORIAL**

Dr. Sergio Zarazúa Guzmán: director de Tesis, Adscrito al Posgrado en Ciencias Farmacobiológicas de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí, S.L.P.

Dra. Ma. Guadalupe Martel Gallegos: Codirector de Tesis, Adscrita al Posgrado en Ciencias Farmacobiológicas de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí, S.L.P.

Dra. Ana Karen González Palomo: Sinodal de Tesis, Adscrita al Posgrado en Ciencias Farmacobiológicas de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí, S.L.P.

Dr. Francisco Javier Pérez Vázquez: Sinodal de Tesis, Adscrito al Posgrado en Ciencias Farmacobiológicas de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí, S.L.P.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SAN LUIS POTOSÍ  
Facultad de Ciencias Químicas  
Centro de Investigación y Estudios de Posgrado  
Posgrado en Ciencias Farmacobiológicas  
Programa de Maestría

Formato M5

## Carta Cesión de Derechos

San Luis Potosí SLP a 01/ 23 /2024

En la ciudad de San Luis Potosí el día 23 del mes de enero del año 2024. La que suscribe **Ángel Álvarez Domínguez** Alumna del programa de posgrado en Ciencias Farmacobiológicas adscrito a la **Facultad de Ciencias Químicas**, manifiesta que es autor(a) intelectual del presente trabajo terminal, realizado bajo la dirección de: **Dra. María Guadalupe Martel Gallegos y Dr. Sergio Zarazúa Guzmán** y cede los derechos del trabajo titulado **Estudio de la Neurotoxicidad Inducida por Metilmercurio en Neuronas y su Relación con el Desarrollo de Enfermedades Neurodegenerativas** a la **Universidad Autónoma de San Luis Potosí**, para su difusión con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir de forma total o parcial texto, gráficas, imágenes o cualquier contenido del trabajo si el permiso expreso del o los autores. Éste, puede ser obtenido directamente con el autor o autores escribiendo a la siguiente dirección [guadalupe.martel@uaslp.mx](mailto:guadalupe.martel@uaslp.mx) y [sergio.zarazua@uaslp.mx](mailto:sergio.zarazua@uaslp.mx). Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.

---

**Angela Álvarez Domínguez**



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SAN LUIS POTOSÍ  
Facultad de Ciencias Químicas  
Centro de Investigación y Estudios de Posgrado  
Posgrado en Ciencias Farmacobiológicas  
Programa de Maestría

Formato M28

### Carta de Análisis de Similitud

San Luis Potosí SLP a 01/ 17 /2024

**L.B. María Zita Acosta Nava**  
Biblioteca de Posgrado FCQ

**Asunto:** Reporte de porcentaje de similitud de tesis de grado

Por este medio me permito informarle el porcentaje de similitud obtenido mediante Ithenticate para la tesis titulada “*Estudio de la Neurotoxicidad Inducida por Metilmercurio en Neuronas y su Relación con el Desarrollo de Enfermedades Neurodegenerativas*” presentada por el autor **Ángela Álvarez Domínguez**. La tesis es requisito para obtener el grado de Maestría en el Posgrado en Ciencias Farmacobiológicas. El análisis reveló un porcentaje de similitud de **14 %** excluyendo referencias y metodología.

Agradezco sinceramente su valioso tiempo y dedicación para llevar a cabo una exhaustiva revisión de la tesis. Quedo a su disposición para cualquier consulta o inquietud que pueda surgir en el proceso.

Sin más por el momento, le envío un cordial saludo.

**ATENTAMENTE**

---

**Dr. Sergio Zarazúa Guzmán**  
Coordinador Académico del Posgrado  
en Ciencias Farmacobiológicas

## **AGRADECIMIENTOS ACADÉMICOS**

Doy gracias a todas las personas que me apoyaron durante la realización de esta tesis, sin su ayuda no se habría finalizado.

Quisiera agradecer al Dr. Sergio Zarazúa Guzmán y a la Dra. María Guadalupe Martel Gallegos por darme la oportunidad de trabajar en su grupo de investigación, por la entera confianza que me han tenido, por apoyarme durante esta etapa académica a la cual me costó mucho terminar, a resolver mis dudas tanto en el ámbito de investigación y de la vida cotidiana, siempre me motivan para ser una mejor profesionista y principalmente enseñarme que uno debe ser responsable, dedicado, constante en la Ciencia, ya que generamos información en pro de la sociedad.

Agradezco al Dr. Aldo Azmar Rodríguez Menchaca y la Dra. Mayra Delgado Ramírez por brindarme todo su apoyo y enseñanzas, gracias por su asesoría en la realización de técnicas de cultivo celular las cuales disfrute mucho aprender y por hacerme sentir parte de su laboratorio. Todo lo que he aprendido de ustedes es parte de mi formación en este mundo de la investigación y por ello siempre les estaré agradecida.

Al Departamento de Dermatología del Hospital Central Ignacio Morones Prieto por permitirme realizar mis ensayos de PCR en tiempo real y en especial a la Dra. Ana Karen González Palomo y al Dr. Diego Cortes por enseñarme con mucha paciencia, apoyarme, y animarme cuando los experimentos no salían como esperaban, además de brindarme parte de su inmenso conocimiento.

Al Dr. Francisco Pérez Vázquez por permitirme realizar mis ensayos de actividad enzimática en su laboratorio del Centro de Investigación Aplicada en Ambiente y Salud, Coordinación para la Innovación y Aplicación de la Ciencia y Tecnología.

A mis docentes de posgrado por tan excelentes cursos y todo lo aprendido.

## **AGRADECIMIENTOS PERSONALES**

Quiero dar gracias a Dios, por permitirme realizar un paso más en mi vida, de disfrutar a mi familia, quienes han creído en mí siempre, dándome ejemplo de superación, humildad y sacrificio, enseñándome a valorar todo lo que tengo.

Agradezco a mi Tita y a mi papá, por haberme dejado tan bonitos recuerdos en mi infancia y buenas enseñanzas de vida, que puedo lograr todo lo que me propongo con toda la disposición y siempre ser agradecida.

Le doy gracias a mi mamá querida, porque ha sido el pilar de mi vida, no tengo todas las palabras para agradecer por todo lo que ha hecho por mí, pero quiero retribuirle todo en vida y que sepa que soy mejor persona gracias a ella.

Agradezco a Erick que me ánimo desde un principio a realizar una maestría cuando aún estábamos estudiando la licenciatura, y por ser mi mejor amigo todo el tiempo darme confianza y apoyo y amor en todo momento, eres mi escape de todos los días para volver empezar.

También quiero agradecer a la Dra. Mayra por su tiempo, su sabiduría y que me acompañó en todo el camino del cultivo celular, muchas gracias por sus platicas tan bonitas sobre la vida y que no hay prisa por hacer todo a la vez, disfrute mucho el tiempo en que iba a hacer mis experimentos en el laboratorio. A la Dra. Ana Karen y al Dr. Diego porque tuvieron mucha paciencia en hacer los experimentos una y otra vez, y por incluirme en sus proyectos y la Química Nelly por acompañarme y conversar cada día para que no se hicieran difíciles los experimentos en el área de dermatología. A todos mis maestros de la FCQ, por enseñarme y motivarme para seguir estudiando cada día de mi vida, sin sus enseñanzas no me hubiera dado la curiosidad y motivación para realizar un grado más.

## **RESUMEN**

La acumulación del péptido beta amiloide (A $\beta$ ) es una característica importante en la enfermedad de Alzheimer. El metilmercurio (MeHg), puede incrementar la acumulación de A $\beta$  en el cerebro, sin embargo, no está claro su mecanismo de neurotoxicidad. En el presente trabajo evaluó la expresión de miR-29a y miR-29b-1 y la actividad de BACE1 en un modelo *in vitro* de células N2a expuestas a MeHg para proponer un probable mecanismo en los procesos neurodegenerativos relacionados con el desarrollo de la EA. Esta investigación presenta evidencia de los efectos de MeHg en la actividad de  $\beta$ -secretasa a través de la alteración en la expresión de miRNAs 29a/b-1 en un modelo *in vitro*, apoyando la hipótesis de que el MeHg podría estar involucrado en el desarrollo de enfermedades neurodegenerativas.

**Palabras clave:** Metilmercurio (MeHg), Enfermedad de Alzheimer (EA), MicroRNAs

## **ABSTRACT**

Accumulation of amyloid beta peptide (A $\beta$ ) is an important feature in Alzheimer's disease. Methylmercury (MeHg) can increase the accumulation of A $\beta$  in the brain, however its mechanism of neurotoxicity is not clear. In the present work, he evaluated the expression of miR-29a and miR-29b-1 and the activity of BACE1 in an in vitro model of N2a cells exposed to MeHg to propose a probable mechanism in the neurodegenerative processes related to the development of AD. This research presents evidence of the effects of MeHg on the activity of  $\beta$ -secretase through the alteration in the expression of miRNAs 29a/b-1 in an in vitro model, supporting the hypothesis that MeHg could be involved in the development of neurodegenerative diseases.

**Keywords:** Methylmercury (MeHg), Alzheimer's Disease (AD), MicroRNAs

## INDICE

1	INTRODUCCIÓN .....	1
1	ANTECEDENTES .....	4
1.1	MERCURIO (Hg).....	4
1.2	INTOXICACIÓN POR METILMERCURIO (MeHg).....	5
1.3	PROTEINA PRECURSORA AMILOIDEA (APP).....	7
1.4	PROCESAMIENTO DE APP.....	8
1.5	MiRNAs.....	10
1.6	REGULACIÓN DEL PROCESAMIENTO DE APP A TRAVÉS DE miRNAs. LOS miRNAs REGULAN LA EXPRESIÓN DE BACE. ....	12
2	JUSTIFICACIÓN .....	16
3	HIPOTESIS.....	17
4	OBJETIVOS .....	17
4.1	OBJETIVOS ESPECIFICOS.....	17
5	MATERIALES Y MÉTODOS .....	18
5.1	CULTIVO CELULAR .....	18
5.2	EXPOSICIÓN DEL CULTIVO A MEDIO DE INTOXICACIÓN.....	19
5.3	EXTRACCIÓN Y CONTROL DE CALIDAD DE LAS MUESTRAS DE RNA TOTAL .....	20
5.4	RETROTRANSCRIPCIÓN (RT).....	21
5.5	AMPLIFICACIÓN POR REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA CUANTITATIVA EN TIEMPO REAL (QPCR) .....	22
5.1	CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS .....	23
5.2	ACTIVIDAD DE B-SECRETASA.....	23
5.3	ANÁLISIS ESTADÍSTICO .....	24
6	RESULTADOS Y DISCUSION.....	25
6.1	ESTANDARIZACIÓN DE LAS CONDICIONES ÓPTIMAS DE CULTIVO E INTOXICACIÓN.....	25
6.2	LOS NIVELES DE MIR29A Y MIR29B SE ENCUENTRAN DISMINUIDOS EN LOS GRUPOS EXPUESTOS A METILMERCURIO.....	27
6.3	ANÁLISIS DE LA ACTIVIDAD DE BACE1 .....	28
6.4	DISCUSIÓN .....	29

7	CONCLUSIÓN .....	33
8	BIBLIOGRAFÍA .....	34
9	ANEXOS .....	47
9.1	ANTECEDENTES .....	47
	FIGURA 1.....	47
	FIGURA 2.....	47
9.2	MATERIALES Y METODOS .....	47
	Tabla 1. ....	47
	Tabla 2. ....	47
	Tabla 3. ....	47
9.3	RESULTADOS .....	47
	FIGURA 3.....	47
	FIGURA 4.....	47
	FIGURA 5.....	48
	FIGURA 6.....	48
	FIGURA 7.....	48
	FIGURA 8.....	48
	FIGURA 9.....	48

# 1 INTRODUCCIÓN

El mercurio (Hg) se considera el elemento no radiactivo más tóxico y es bien conocido por sus efectos neurotóxicos. Es el único metal que es líquido a temperatura ambiente (punto de congelación  $-39.6\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) y se evapora en cantidades relevantes. El mercurio es un metal de preocupación mundial por varias razones: su transporte a largo plazo en la atmósfera, su persistencia en el medio ambiente después del aporte antropogénico, su biodisponibilidad en los ecosistemas y su grave impacto en la salud humana y el medio ambiente (UNEP, 2013). Durante las últimas tres décadas en que se produjo mercurio en nuestro país, en particular al recuperarlo como subproducto de la extracción de plata y oro a partir de jales antiguos mineros en los estados de Querétaro, San Luis Potosí y Zacatecas, (CCA, 2011; CCA, 2013) y que representa la forma más fácil de extracción, económica y por ende, rentable para la actividad minera artesanal de oro, ya que generalmente se desarrolla en comunidades vulneradas, marginadas y de escasos recursos generando o diversos problemas ambientales, sociales y sobre todo de salud para los grupos que se dedican a su extracción a través de técnicas y práctica rudimentarias (Castro, 2013). ). El mercurio existe en el medio ambiente en tres formas químicas diferentes: vapor de mercurio elemental ( $\text{Hg}^0$ ), sales de mercurio inorgánico y por acción de las bacterias, el mercurio orgánico (Yilmaz 2014). La distribución, la toxicidad y el metabolismo del mercurio dependen en gran medida de su forma química y su vía de exposición y se ha documentado que la exposición al Hg provoca diversos efectos adversos en riñón, sistema cardiovascular, sistemas reproductor e inmunológico y sistema nervioso central (SNC) causando neuropatías periféricas y desarrollo de enfermedades neurodegenerativas (Bjørklund, 2019). Los compuestos orgánicos de mercurio, como el metilmercurio (MeHg), se han estudiado ampliamente porque son capaces de alcanzar niveles altos en SNC, por lo que se asocia efectos neurotóxicos (Aschner, 2007, Clarkson y Magos, 2006).

La intoxicación humana por MeHg se dio a conocer por un desastre catastrófico de contaminación ambiental en Japón, que dio origen a la conocida actualmente como Enfermedad de Minnamata, que se caracteriza por trastornos del movimiento, convulsiones, alteraciones conductuales, malformaciones congénitas y en casos graves, la muerte. Las bajas concentraciones de mercurio pueden inducir estrés oxidativo, citotoxicidad y neurotoxicidad por distintos mecanismos involucrados, actualmente explorados son el deterioro de la homeostasis del calcio intracelular (Danbolt, 2001; Sirois y Atchison, 2000), el estrés oxidativo al unirse fuertemente a grupos tiol o selenoproteínas (Zhang, 2016), la alteración de la homeostásis del glutamato (Aschner, 2007; Farina, 2011) y la inducción de la producción del péptido A $\beta$ <sub>40-42</sub> (Olivieri, 2000), lo que puede conducir a enfermedades neurodegenerativas, como son las enfermedad de Parkinson y Alzheimer (EA) (Bjørklund, 2019) .

La EA es una enfermedad crónico-neurodegenerativa, progresiva, irreversible y de origen multifactorial, con una frecuencia de presentación del 50 al 70% de los ancianos mayores de 80 años afectados (Mutter, 2010). Clínicamente, la EA se revela a través del aumento del deterioro cognitivo, la atención deteriorada y la memoria a corto plazo y, en etapas posteriores, otras formas de incompetencia cognitiva, como el lenguaje deteriorado, el reconocimiento facial y la orientación espacial. El sello histopatológico de la EA es la acumulación de ovillos neurofibrilares compuestos principalmente de proteína tau anormalmente hiperfosforilada y de placas neurofibrilares formadas por acúmulos de péptido  $\beta$ -amiloide (A $\beta$ ), un producto derivado del catabolismo de la proteína precursora del amiloide (APP) a una velocidad mayor que la que se puede eliminar (Aaseth, 2016; Bjørklund, 2019; Girek y Szymański 2019). Por lo anterior, resulta relevante estudiar el efecto que ejercen las neurotoxinas ambientales como el MeHg sobre la actividad de las enzimas involucradas en las vías de procesamiento del péptido A $\beta$  y su relación con el desarrollo de enfermedades neurodegenerativas. Existen diversos mecanismos que regulan la expresión génica a nivel postranscripcional, entre ellos, se encuentran los micro RNAs (miRNAs). La creciente relevancia de los miRNAs en biología ha impulsado la investigación sobre su posible

participación en la neurodegeneración para identificar nuevos objetivos terapéuticos. Por lo anterior, El estudio actual representa la primera evidencia de los efectos de la exposición a MeHg en la actividad de  $\beta$ -secretasa en un modelo in vitro a través de la alteración en la expresión de miRNAs 29a/b-1, apoyando la hipótesis que sugiere que el MeHg podría estar involucrado en el desarrollo de enfermedades neurodegenerativas, específicamente, la enfermedad de Alzheimer.

# 1 ANTECEDENTES

## 1.1 MERCURIO (Hg)

El mercurio es un elemento con el número atómico de 80. Es el único metal en la tierra que es líquido a temperatura ambiente. Este se encuentra en tres formas químicas: Mercurio elemental ( $\text{Hg}^0$ ), que se puede encontrar como un metal líquido o en forma de vapor (vapor tóxico inodoro e invisible); mercurio inorgánico ( $\text{Hg}^+$  y  $\text{Hg}^{2+}$ ) y mercurio orgánico (metilmercurio,  $\text{MeHg}$ , o etilmercurio,  $\text{EtHg}$ ) (Zhang, 2016; US EPA, 2020). Este metal es de relevancia para la extracción de metales como el oro y la plata en nuestro país. La minería en México ha sido una de las actividades económicas más importantes durante varios siglos. En 2018, el sector minero representó el 2,4% del Producto Interno Bruto del país, de los cuales aproximadamente \$9 millones se destinaron a la exportación de mercurio a países latinoamericanos; Bolivia, Cuba y Panamá son los principales destinos (SGM, 2019). Fuentes de información local confirman que Querétaro, San Luis Potosí y Zacatecas cuentan con aproximadamente 300 depósitos de mercurio y figuran como los principales productores de mercurio a nivel nacional (SEDESU, 2013; SGM, 2015). A pesar de la importancia de la minería del mercurio para la economía nacional, se sabe poco sobre la extracción de dicho metal y desde 1994 resulta muy difícil poder conocer cuál es la cifra real de su producción emanada de fuentes informales e informales. Sin embargo, se ha estimado que al menos la mitad proviene de minas artesanales dentro de comunidades en situación de pobreza, marginación y rezago social causando muchos problemas de salud (Castro, 2013).

Según la duración, la dosis y la vía de exposición, así como la forma del mercurio y la condición de la persona expuesta, el mercurio puede exhibir una toxicidad significativa en el sistema cardiovascular, riñón, pulmones y el SNC (Cariccio, 2019). El punto más común de exposición al mercurio son los alimentos de origen del mar como los pescados y mariscos, que al entrar al organismo de estas concentraciones de

mercurio se bioacumulan y biomagnifican, y al ser ingeridos, este es capaz de alcanzar niveles altos en SNC generando neurotoxicidad (Zhang, 2016).

## **1.2 INTOXICACIÓN POR METILMERCURIO (MeHg)**

La intoxicación humana por MeHg se dio a conocer por las epidemias catastróficas de contaminación ambiental por MeHg en Japón, ya que una investigación epidemiológica en el distrito de Minamata mostró que varios gatos alimentados con peces contaminados con Hg presentaban una condición severa llamada en esos días “enfermedad del baile” que se caracterizaba por trastornos del movimiento, convulsiones y la muerte. La Organización Mundial de la Salud (OMS) en el 2017 establece como límite máximo permisible una concentración de 0.001 mg/L de Hg en agua. En México, la normatividad establece un límite máximo de 0.001 mg/L en agua (NOM-127-SSA1-1994) y un límite máximo de emisión de 0.07 mg/mL de Hg (PROYNOM-098-ECOL-2000). La Comisión Europea y la EPA/FDA han proporcionado niveles seguros de mercurio en los alimentos (EPA, 2018; Comisión Europea, 2018). Los niveles mínimos de riesgo de exposición crónica al mercurio por inhalación se han determinado a un nivel de 0.0002 mg/m<sup>3</sup>, mientras que La exposición oral crónica al metilmercurio se define en: 0,0003 mg/kg/día (CDC, 2018). Sin embargo, para la estimación de la dosis interna de mercurio y sus riesgos para la salud humana, es esencial realizar un biomonitoreo humano. Clínicamente, la exposición tóxica resulta en tres etapas sintomáticas, dependiendo de la susceptibilidad individual. Inicialmente, el paciente experimenta un síndrome similar a la gripe con fiebre, dolor de cabeza, mialgias, escalofríos y sequedad de boca/garganta (fiebre por humos metálicos). La segunda etapa se manifiesta después de 2 semanas como síntomas neurológicos, respiratorios y renales. Los síntomas gastrointestinales son preeminentes e incluyen sabor metálico, sed, dolor abdominal, náuseas y vómitos, estreñimiento y anorexia. Los síntomas en la tercera etapa son principalmente neuropsiquiátricos que se manifiestan después de la exposición crónica.

La exposición aguda a vapores de mercurio puede producir toxicidad del sistema nervioso central, que se manifiesta como temblores, parestesia, pérdida de memoria, hiperexcitabilidad, eretismo y retraso en el reflejo (Yilmaz, 2014). Estos síntomas también han sido reportados en estudios experimentales sobre los efectos prenatales de MeHg con gatos, perros, ratas, monos y pez cebra y mostraron una interrupción significativa en el desarrollo postnatal del sistema antioxidante GSH desencadenando cambios bioquímicos duraderos asociados con el estrés oxidativo (Farina, 2011).

Se ha informado que el Hg tiene un efecto importante en la inducción de la generación de A $\beta$  insoluble a través de la inducción de estrés oxidativo y la generación de neurotoxicidad, mediante el proceso de precipitación de A $\beta$ , siendo una pieza importante en la patogénesis de la EA (Olivieri, 2000, Monnet-Tschudi, 2006; Salinaro, 2018). El A $\beta$  es un péptido de un peso molecular de 4 kDa y una secuencia proteica primaria de 38-43 aminoácidos que sigue la ruta secretora en su formación (retículo endoplasmático, aparato de Golgi y endosomas), o que se puede introducir en las células a través de la proteína relacionada con el receptor de lipoproteínas de baja densidad. Existen diversas especies del péptido A $\beta$ , entre ellas, A $\beta$ 40 y A $\beta$ 42, que son productos resultantes del catabolismo de la proteína precursora amiloidea (APP) a cargo de las enzimas  $\beta$  y  $\gamma$ -secretasas. De estas dos principales formas de A $\beta$ , el A $\beta$ 42 es más tóxico y forma agregados y placas con mayor facilidad que el A $\beta$ 40 (Findeis, 2007). Se ha planteado la hipótesis de que los oligómeros A $\beta$  pueden mediar aspectos de la pérdida de memoria en ratones transgénicos que sobre expresan APP (Kotilinek, 2002). Un estudio de Olivieri et al. (2000) reportan que la secreción de péptido A $\beta$ 40 y A $\beta$ 42 en las células de neuroblastoma SHSY5Y tratadas con Hg fueron diferentes a las células no tratadas. En particular, la producción de A $\beta$ 40 fue máxima después de 4 h de exposición a Hg, mientras que la secreción de A $\beta$ 42 fue máxima después de 6 h. Los autores atribuyen que el incremento de liberación de A $\beta$  es inducido por la acción nociva del Hg sobre las enzimas quinasas involucradas en la vía de la  $\alpha$ -secretasa del metabolismo de la APP. El resultado podría ser que las células son empujadas hacia la vía de la  $\beta$ -secretasa del metabolismo de la APP, lo que resulta en

un aumento en la liberación de A $\beta$ . En el 2013, Song JW y Choi BS trataron con HgCl<sub>2</sub> (Hg) y CH<sub>3</sub>HgCl<sub>2</sub> (MeHg) a 10, 100 y 1000 nM durante 48 h en células PC12. Después del tratamiento, la producción del péptido A $\beta$ <sub>40</sub> en medio de cultivo aumentó de manera dependiente de la dosis y el tiempo. Hg y MeHg aumentaron la proteína precursora de amiloide (APP), que está relacionada con la producción de A $\beta$ . Los niveles de neprilisina (NEP) que es una enzima encargada de la degradación de los péptidos A $\beta$  en las células PC12 disminuyeron con el tratamiento con Hg y MeHg. Estos resultados sugirieron que el Hg indujo la acumulación de A $\beta$  a través de la sobreproducción de APP y la reducción de NEP.

### **1.3 PROTEINA PRECURSORA AMILOIDEA (APP)**

La APP es una proteína transmembranal expresada en el SNC, involucrada en el crecimiento de neuritas y sinaptogénesis, tráfico de proteínas neuronales, señalización transmembrana, adhesión celular y metabolismo de calcio (Menéndez-González, 2005). El gen que codifica para APP se encuentra en el cromosoma 21 en humanos. Hay tres isoformas principales de APP: APP695, APP751 y APP770, las últimas dos se expresan en la mayoría de los tejidos y tienen un dominio Inhibidor de Proteasa Kunitz (KPI) de 56 aminoácidos en sus regiones extracelulares, mientras que APP695 no tiene el dominio KPI y se expresa principalmente en neuronas (Menendez-Gonzales, 2005). APP695 también posee en su estructura un dominio A $\beta$  de 28 residuos extracelulares y un fragmento pequeño de 12 a 14 residuos en la porción transmembranal. APP es sintetizada en el retículo endoplásmico (RE) y después es enviada a través del aparato de Golgi a la red-Golgi-trans (TGN) para luego ser transportada en vesículas secretoras a la superficie de la célula donde se reinternaliza mediante una vía de degradación endosomal/lisosomal (Sisodia, 1992).

## 1.4 PROCESAMIENTO DE APP

Una vez que APP se inserta en la membrana puede ser escindida por enzimas conocidas como secretasas:  $\alpha$ -secretasa,  $\beta$ -secretasa (BACE) y  $\gamma$ -secretasa.

La vía no amiloidogénica es llevada a cabo por  $\alpha$ -secretasa generando el fragmento soluble de APP (sAPP $\alpha$ ) y el fragmento carboxi-terminal ( $\alpha$ -CTF), que, a su vez, es escindido por el complejo  $\gamma$ -secretasa intramembranal liberando el péptido p83. Este último fragmento se degrada rápidamente y se cree que no posee ninguna función importante (Blennow, 2006). La escisión de APP por  $\alpha$ -secretasa impide la formación de A $\beta$  debido al corte en el sitio Lys16-Leu17, dentro del dominio de A $\beta$ . (FIGURA 1)

Por su parte, la vía amiloidogénica es mediada por  $\beta$ -secretasas una aspartil proteasa integral de la membrana llamada sitio de escisión  $\beta$ -APP de la enzima 1 (BACE1) (Vassar, 2007) que libera un fragmento de APP soluble (sAPP $\beta$ ) y el fragmento  $\beta$ -CTF. Este último es escindido por el complejo de proteasa intramembranal que consta de cuatro componentes: presenilina-1, nicastrina, PEN-2, y APH-1 denominada  $\gamma$ -secretasa liberando el dominio intracelular de APP (AICD) (Zhang, 2011) y péptidos A $\beta$  de 38 a 43 aminoácidos. El péptido A $\beta$  (1-42) es más hidrófobo y tóxico por lo que tiene a depositarse conduciendo a la formación de las placas seniles en la EA. Estas placas neuronales desencadenan un proceso inflamatorio reactivo que daña irreversiblemente las neuronas.

Es importante señalar que las dos vías de procesamiento de APP no se producen al mismo tiempo, sino que ocurre en dos etapas distintas de la vida. La vía de procesamiento por  $\alpha$ -secretasa se encuentra activa durante la juventud sin embargo con el envejecimiento se vuelve ineficaz y de esta manera la vía amiloidogénica se "hiperactiva". Dado que la enzima  $\alpha$ -secretasa es específica y exclusiva de APP, una vez que se vuelve ineficaz, el sitio de reconocimiento no puede ser atacado por otras proteasas. Por lo tanto, APP queda susceptible para ser escindida por otras proteasas

entre ellas se encuentra  $\beta$ - y  $\gamma$ -secretasas y de esta manera se producen los fragmentos de  $A\beta$  (Chen, 2015).

APP se considera funcionalmente importante porque estudios en ratones, donde, al carecer de todos los genes de la familia APP, presentan un déficit de crecimiento posnatal; sin embargo, también es la fuente de  $A\beta$  durante el desarrollo de AD (R. Lin, 2008). Las enzimas de corte de APP de dos sitios (BACE1, originalmente denominada BACE; y BACE2) están involucradas en la producción de  $A\beta$ . BACE1 es el principal responsable de la escisión de APP in vivo, y la sobreexpresión de BACE1 aumenta la producción de  $A\beta$  in vitro (Blennow, 2006). Por el contrario, la regulación a la baja de la expresión del gen BACE1 por el tratamiento de oligonucleótidos antisentido disminuye la producción de C99 (un producto C-terminal de la escisión de APP por BACE1), lo que conduce a la reducción de  $A\beta$  (Cai, 2001) Por lo tanto, tanto APP como BACE1 se consideran componentes fundamentales en la producción de  $A\beta$ . Dado que menos del 10% del total de casos de DA están asociados con factores genéticos (Kopan, 2004), es extremadamente importante investigar cómo los factores ambientales contribuyen a la patogénesis de esta enfermedad.

Varios estudios mostraron que algunos iones metálicos (cobre, hierro y calcio, etc.) modulaban la expresión de APP in vitro o in vivo (Wu, 2008, Turner, 2006; Rossi, 2006). Sin embargo, no se encontraron informes que descubrieran los efectos de los iones pesados en la expresión de BACE1. Debido a que los elementos reguladores de metales se encuentran tanto en la región 5'UTR de APP como de BACE1 (Basha, 2005), no se sabe bien el papel de los metales en las expresiones de APP y BACE1 y a qué nivel transcripcional actúan ya que los efectos directos de los iones metálicos y sus mecanismos sobre los niveles de ARNm de APP y BACE1 no se han descubierto por completo.

Debido a lo anterior, se han propuesto diversos candidatos como moduladores de la actividad de las secretasas, incluyendo a los receptores mACh, 5-HT<sub>4</sub>, los purinérgicos P2X<sub>7</sub> y P2Y<sub>2</sub>, así como diversos microRNAs (miRNAs)(Kriegel, 2012; Deng, 2013; Zeng, 2019)

## **1.5 MiRNAs**

Recientemente, el estudio de los miRNAs ha cobrado importancia debido a su utilidad como biomarcadores de efecto, ya que diversos estudios demuestran su presencia en fluidos biológicos y su modificación ante diversos estadios fisiopatológicos. Lo que resulta relevante en el estudio de patologías del Sistema Nervioso Central (SNC), y hasta la fecha, los biomarcadores de daño nervioso central son limitados debido a la presencia de las barreras naturales de SNC y la rápida degradación enzimática de las moléculas de desecho en el tejido nervioso.

La secuenciación del genoma humano ha demostrado que la producción transcripcional del genoma humano es extremadamente rica en RNAs no codificantes (ncRNA) (H. Jia, 2010). Se pueden distinguir dos clases importantes de ARN funcionales: ARN largos no codificantes (lncRNA) y ARN pequeños. La biogénesis y la función de los ARN pequeños es bien conocida y se puede dividir en cinco clases: 1) ARN interferentes cortos (si) (Elbashir, 2001), 2) pequeños ARN temporales (st) (Pasquinelli, 2000), 3) ARNip heterocromáticos (Reinhart y Bartel, 2002), 4) pequeños ARN no codificantes (Ambros, 2003) y 5) micro (mi) ARN (Lagos-Quintana, 2001). La función típica de los ARN pequeños es mediar el silenciamiento génico postranscripcional (PTGS) de las transcripciones de ARN objetivo.

Las transcripciones primarias de miARN (pri-miARN) se transcriben mediante ARN polimerasa II, en el núcleo, estas transcripciones son procesadas por el complejo de nucleasas Drosha/DGCR8 para producir los llamados miRNAs precursores (pre-miRNAs), que tienen aproximadamente 70 nucleótidos de longitud y se caracterizan por una estructura de tallo. Después de la exportación nuclear por Exportin 5/Ran,

Dicer, una enzima que segmenta los pre-miRNA en el citoplasma (Cuellar, 2008), para generar miRNAs maduros (ARN bicatenario de 21-22nt). Solo una de las dos cadenas se carga en el complejo silenciador inducido por ARN (RISC) que identifica el ARNm objetivo en función de la complementariedad de secuencia con el miARN. Uno de los componentes centrales de RISC es miembro de la familia de proteínas Argonaute (Ago), en particular Ago1 y Ago2. Después de la asociación con RISC, la elección de la represión postranscripcional se determina mediante la complementariedad de secuencia del miARN con su secuencia de unión en el 3' UTR del ARNm objetivo: la escisión del ARNm ocurrirá cuando haya suficiente complementariedad, de lo contrario se producirá la inhibición de la traducción de proteínas. (Elbashir, 2001).

Determinar cómo los cambios en los niveles de expresión de miRNA se traducen en función biológica sigue siendo un desafío; la clave radica en identificar genes diana específicos para miRNA desregulados y comprender qué factores patógenos desencadenan su desregulación (Schonrock, 2011). Esto es particularmente cierto para las enfermedades neurodegenerativas en las que uno encuentra una red de interacciones, con miRNAs que regulan mRNAs clave como APP, mientras que uno de los principales productos proteolíticos de la aplicación, A $\beta$ , regula una gran cantidad de miRNAs que a su vez puede crear un circuito regulador de retroalimentación en niveles de transcripción de APP.

## **1.6 REGULACIÓN DEL PROCESAMIENTO DE APP A TRAVÉS DE miRNAs. LOS miRNAs REGULAN LA EXPRESIÓN DE BACE.**

Se ha documentado que muchos miRNA regulan directamente los niveles de expresión de APP en su 3' UTR. Recientemente, el grupo de Lahiri informó una actividad novedosa de miR-346: específicamente, que se dirige al ARNm de APP 5'-UTR para regular al alza la traducción de APP y la producción de A $\beta$  (Long, 2019). Esta regulación positiva se reduce, pero no se elimina por la eliminación de la proteína argonaute 2. El sitio objetivo para miR-346 se superpone con sitios activos para un elemento sensible al hierro (IRE) y un elemento de caja aguda de interleucina-1 (IL-1). Los IRE interactúan con la proteína de respuesta al hierro 1 (IRP1), un represor de la traducción dependiente del hierro. En cultivos primarios de cerebro humano, la actividad de miR-346 requería la quelación de Fe. Además, los niveles de miR-346 se alteran en la etapa tardía de la EA. Por lo tanto, miR-346 desempeña un papel en la regulación positiva de APP y en el aumento de la formación de A $\beta$  en cerebros con EA (Long, 2019). Además, la 3'UTR del gen APP también está muy involucrada en la regulación de APP.

Investigaciones anteriores han demostrado que la enzima de escisión de la proteína precursora de amiloide del sitio  $\beta$ , (BACE)-1, es esencial para la generación de A $\beta$  a partir de la escisión de la proteína precursora de amiloide (APP). La escisión estimula el factor de transcripción nuclear (NF- $\kappa$ B) que lleva a la secreción de citocinas inflamatorias (Li y Wang, 2018). El estudio de Geng demostró cómo algunos miARN pueden activar PPAR-gamma, lo que también conduce a la activación de NF- $\kappa$ B, lo que conduce aún más a la liberación de citocinas y la producción de A $\beta$  (Geng, 2018). Varios miARN también actúan para aumentar la producción de A $\beta$  a través de la vía de señalización de Notch. Específicamente, se muestra que los miARN inhiben los niveles de proteína HEY2, lo que inactiva la vía de señalización de Notch. Esta vía de Notch es responsable de suprimir la producción de A $\beta$  entre muchas otras funciones en el estado sin EA (Chen, 2019). Otro de los muchos mecanismos por los que se proponen los miRNA para regular la producción de beta-amiloide es a través de la

señalización de la insulina (Higaki, 2018). La investigación de Higaki detalló cómo la familia miR-200 inhibe la expresión de la proteína ribosomal S6 quinasa B1 (S6K1), un efector aguas abajo del objetivo de rapamicina en mamíferos (mTOR). La proteína mTOR normalmente suprimiría la liberación de insulina, lo que conduce a la resistencia a la insulina, que normalmente se observa en los cerebros con AD. En el laboratorio de Feng, destacaron otro mecanismo a través del cual los miARN pueden alterar los niveles de amiloide- $\beta$ . Muestran cómo miR-21 puede inhibir la apoptosis inducida por A $\beta$  (Feng, 2018). Normalmente, A $\beta$  podría aumentar Bax e inhibir los niveles de proteína Bcl-2. Ambas acciones comprometerían la membrana celular de las células y conducirían a la muerte celular eventual. MiR-21 se regula al alza en la EA para invocar su efecto protector al aumentar la actividad de la vía de la fosfatidilinositol 3-quinasa/proteína quinasa B (también conocida como PI3K/AKT) y aumentar los niveles de glucógeno sintasa quinasa-3 $\beta$  (GSK-3 $\beta$ ). Estas vías de señalización disminuyen la muerte celular inducida por A $\beta$ .

La familia de genes miR-29 incluye tres miembros: miR-29a, miR-29b y miR-29c están altamente conservados en humanos, ratones y ratas. Los miR-29 maduros comparten secuencias idénticas en las posiciones de nucleótidos 2–7 (región semilla) que juega un papel clave en la determinación de qué genes codificadores de proteínas atacaría un microARN (FIGURA 2). En humanos, miR-29a y miR-29b-1 están ubicados en el cromosoma 7q32, separados por 652 bases, y tienen los mismos transcritos de pri-miRNA. Los análisis RACE y RT-PCR han confirmado que miR-29b-1 y miR-29a se transcriben juntos como una transcripción primaria policistrónica. En el cerebro del ratón, miR-29 se expresa a aproximadamente a las 2 semanas después del nacimiento y se marca notablemente durante el envejecimiento normal (Hébert, 2009 y 2010; Smirnova, 2005) y se expresa altamente en astrocitos y neuronas primarias maduras in vitro. Se ha reportado que la inhibición indirecta de la APP a través de miRNA es a través de la regulación negativa directa de los genes en las vías que regulan la expresión, la función o el procesamiento de esta proteína. La  $\beta$ -secretasa BACE1, el factor de crecimiento similar a la insulina 1 (IGF-1) y la serina palmitoiltransferasa

(SPT) influyen en la expresión de APP y están modulados por miRNAs. BACE1 desempeña un papel fundamental en la regulación de la producción de A $\beta$  al escindir APP y liberar APP $\beta$ . (Kole, 2011; Smirnova, 2005)

Basado en la regulación de la expresión de miR-29b, podemos intuir que miR-29b desempeñaría un papel importante en la homeostasis neuronal en el cerebro adulto. Se ha demostrado que el grupo miR-29a/b-1 se expresa altamente en cerebro y ha mostrado niveles de expresión desregulados en trastornos neurodegenerativos. En estudios de Hebert, demostró la inhibición in vitro de BACE1 por miR-29a, miR-29b-1 y miR9 y además confirmó una asociación entre la regulación a la baja de estos miRNAs y AD (Hebert, 2008). Los ratones que sobre-expresan miR-29c se caracterizan por la baja regulación de los niveles de BACE1, lo que demuestra un efecto in vivo sobre la modulación de BACE1 (Zong, 2011). miR-29b suele dirigirse a BACE1 en pacientes con AD esporádicos (Hébert et al. 2009), en casos de ataxia espinocerebelosa (Roshan et al. 2012), en el desarrollo cerebral de ratones y en cultivos neuronales primarios (Hébert et al., 2009; Smirnova et al., 2005). Se informó que miR-29b regulaba la glucoproteína secretada humana progranulina, que participa en la demencia frontotemporal (Routhier, 2010). miR-29b también se encuentra entre una lista de miRNAs que fueron regulados al alza en exosomas liberados del modelo celular enfermedad por priones (Bellingham, 2012). En un estudio de Kole et al. demostraron que miR-29b funciona como un inhibidor de la apoptosis neuronal en neuronas P5 jóvenes, al dirigirse a múltiples miembros de la familia de genes proapoptóticos de BH3 (Kole, 2011). Los datos de estudios clínicos por parte de Teng Ma et al. encontraron que miR-29a/101 en sangre periférica de pacientes con EA estaban marcadamente regulados a la baja en comparación con los controles normales y su análisis de regresión logística reveló que la combinación de sangre completa periférica miR-29a / 101 podría ser un biomarcador potencial de EA con mejor especificidad (82 %) y sensibilidad (75 %) (Teng Ma, 2016). También se sabe que las ceramidas de membrana contribuyen a la patología de la EA al facilitar la mala ubicación de BACE1 y  $\gamma$ -secretasa a las balsas lipídicas, promoviendo así la formación

de A $\beta$  (Vetrivel, 2005) y curiosamente SPT (enzima limitante de la velocidad en la vía de síntesis de ceramida de Novo) aumente en el cerebro de los pacientes con EA esporádico con la regulación a la alza de varios miRNA incluidos miR-9, miR-29b-1, miR29a y miR137. En un ensayo de luciferasa in vitro por parte de Geekiyanage y Chan confirmaron la inhibición directa de SPT (SPTLC1) por parte de miR-181c y miR-137 y de SPTLC2 por miR-29a, miR-29b1 y miR-9 (Geekiyanage y Chan, 2011).

En los últimos años, los miARN han surgido como una herramienta viable para investigar la regulación postranscripcional de un conjunto de genes involucrados en varias respuestas de toxicidad de metales pesados, incluida la toxicidad de Hg. Distintos estudios de análisis de perfil del miRNAs en plasma y cultivos neuronales han encontrado la expresión de miRNAs significativamente regulados al alza o la baja en los grupos expuestos con Hg en comparación con los controles (Wallace, 2020) pero no hay evidencia que hable sobre sobre el efecto del mercurio sobre la expresión de la familia de miRNA-29 y su implicación en EA por lo que resulta de interés investigar las consecuencias de esto.

## 2 JUSTIFICACIÓN

El mercurio es un metal de relevancia mundial debido a su transporte a larga distancia en la atmósfera, su persistencia en el medio ambiente tras su introducción antropogénica, su capacidad de bioacumulación en los ecosistemas y sus importantes efectos adversos para la salud humana y el medio ambiente. Diversos estudios muestran que los compuestos mercuriales como el metilmercurio pueden afectar al SNC, dando pie al desarrollo de enfermedades neurodegenerativas, como la enfermedad de Alzheimer (EA). Aunque la EA se ha convertido en un foco importante de investigación, los mecanismos moleculares subyacentes a su patogenia siguen siendo en gran medida desconocidos. Hasta el momento, no hay estudios que evalúen si la exposición a este organometal induce una sobre producción de A $\beta$ 42 en células neuronales por un mecanismo inhibitorio en la expresión de miRNAs reguladores del procesamiento de la APP, contribuyendo en la neurodegeneración relacionada con la EA.

### **3 HIPOTESIS**

La exposición a metilmercurio en cultivos neuronales disminuye la expresión de miR-29a y miR-29b-1 induciendo un incremento en la actividad de BACE1 lo cual conduce a sobreproducción de péptido A $\beta$ 42, lo que contribuye con la neurodegeneración de la EA.

### **4 OBJETIVOS**

Evaluar la expresión de miR-29a y miR-29b-1 y asociarlo con la actividad de BACE1 y escisión del péptido A $\beta$ (1-42) en un modelo *in vitro* de neuronas de neuroblastoma de ratón expuestas a metilmercurio para establecer un probable mecanismo en los procesos neurodegenerativos relacionados con el desarrollo de la enfermedad de Alzheimer.

#### **4.1 OBJETIVOS ESPECIFICOS**

- a) Establecer las condiciones óptimas que reflejen la neurotoxicidad inducida por MeHg en las células de neuroblastoma de ratón Neuro2a a través de ensayos de viabilidad celular en comparación con un grupo control sin exposición.
- b) Evaluar la expresión de miR-29a y miR29b-1 por medio de la técnica de RT-qPCR.
- c) Determinar la actividad de  $\beta$ -secretasa (BACE1) mediante un ensayo tipo FRET en los lisados celulares en comparación del grupo control y los grupos expuestos al MeHg.

## **5 MATERIALES Y MÉTODOS**

### **5.1 CULTIVO CELULAR**

Se utilizó la línea celular de neuroblastoma de ratón Neuro 2a (N2a) obtenida de ATCC. Esta línea celular proviene de células de neuroblastoma cerebral de ratón albino y se caracteriza por tener un crecimiento adherente y una morfología neuronal ameboide. Se seleccionó esta línea debido a su amplia versatilidad, además que ha sido utilizada para estudios de vías de señalización y procesos de diferenciación neuronal, adicionalmente se ha utilizado como modelo para estudiar la EA ya que expresa de manera endógena APP. Se sembraron en pases 1:6-1:12 según las necesidades al alcanzar una confluencia del 90%.

## 5.2 EXPOSICIÓN DEL CULTIVO A MEDIO DE INTOXICACIÓN

Las células destinadas para cada grupo (control y MeHg) se observaron constantemente, al alcanzar una confluencia del 85% se expusieron a los medios de intoxicación respectivos, al grupo control se le realizó cambio de medio, mientras que los grupos expuestos a MeHg fueron incubados en presencia de A, B y C  $\mu\text{M}$  con el compuesto tóxico respectivamente durante 24 horas a  $37^{\circ}\text{C}$  para posteriormente medir su viabilidad mediante el ensayo MTT. Este ensayo se basa en la reducción metabólica del Bromuro de 3-(4,5- dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT) realizada por la enzima mitocondrial succinato-deshidrogenasa en un compuesto coloreado de color azul (formazan), permitiendo determinar la funcionabilidad mitocondrial de las células tratadas. Este método es utilizado para medir la viabilidad y proliferación celulares. La cantidad de células vivas es proporcional a la cantidad de formazán producido. Las concentraciones utilizadas se determinaron mediante el ensayo de viabilidad celular de MTT donde se estableció la concentración y el tiempo de exposición en la línea celular N2a de acuerdo con los criterios de la normatividad internacional ISO 10993-5:2009 (Ensayos de citotoxicidad in vitro) donde se estipula que un porcentaje mayor al 80% de viabilidad celular no presenta un efecto citotóxico.

Al cumplir el periodo de exposición se realizó la colecta de las células y se destinaron a extracción de proteínas y extracción de RNA.

### **5.3 EXTRACCIÓN Y CONTROL DE CALIDAD DE LAS MUESTRAS DE RNA TOTAL**

La extracción de RNA total a partir del cultivo celular N2a con y sin exposición a MeHg, se realizó siguiendo el protocolo descrito para TRIzol® Reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) cuyo fundamento está basado en el uso de una solución monofásica de fenol e isotiocianato de guanidina que permite la obtención de moléculas de RNA de tamaño variado. El reactivo de TRIzol mantiene la integridad del RNA al inhibir eficientemente la actividad RNAasa al momento de romper y homogenizar las células. Después de homogenizar la muestra, se añadió cloroformo, lo que permite la separación de una fase acuosa superior (conteniendo el RNA), una fase intermedia (contiene DNA), y una fase inferior orgánica (conteniendo proteínas). Tras la separación de la fase acuosa a un nuevo tubo, el RNA se precipitó empleando isopropanol y por último, se realizaron lavados con etanol al 70%. Posteriormente, se procedió a analizar la calidad del RNA total obtenido.

La concentración de RNA en las muestras extraídas se determinó mediante un espectrofotómetro UV-Visible, cuantificando la absorbancia a 260 nm. El grado de pureza del RNA se estimó a partir del cociente entre la absorbancia de la muestra medida a 260 nm y a 280 nm ( $A_{260}/A_{280}$ ) el cual, para una disolución de RNA puro, debe tener un valor igual o muy próximo a 2.

#### 5.4 RETROTRANSCRIPCIÓN (RT)

Los experimentos de RT y PCR en tiempo real se realizaron en el laboratorio de Dermatología del Hospital Central Dr. Ignacio Morones Prieto. La síntesis de DNA complementario (cDNA) a partir de 2.5 µL de RNA total extraído de las células N2a con y sin exposición se realizó utilizando el kit Transcripción Inversa de ADNc Alta Capacidad (Applied <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/4368814>).

#### 4. Configuración para la reacción RT:

Nota: Se puede utilizar un termociclador o sistema de PCR tiempo real para llevar a cabo la reacción, si es así, realizar la transcripción reversa en modo estándar (default).

Programar el termociclador con los siguientes parámetros:

Tipo de paso	Tiempo (minutos)	Temperatura (°C)
HOLD	30	16
HOLD	30	42
HOLD	5	85
HOLD	∞	4

Posteriormente se cuantificó el cDNA obtenido mediante un espectrofotómetro UV-Visible cuantificando la absorbancia a 260 nm. El grado de pureza del cDNA se estimó a partir del cociente entre la absorbancia de la muestra medida a 260 nm y a 280 nm ( $A_{260}/A_{280}$ ) el cual, para una disolución de DNA puro, debe tener un valor igual o muy próximo a 2, lo que se obtuvo. (TABLA 1, 2 Y 3)

## 5.5 AMPLIFICACIÓN POR REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA CUANTITATIVA EN TIEMPO REAL (QPCR)

Posterior a la transcripción reversa, el producto de dicha reacción (cDNA) se cuantifica y se ajusta la concentración a 100 ng/ $\mu$ L. \*Se utilizaron los TaqMan Probe oligonucleótidos diseñados a partir de miRbase data, para miR29a se usó el mmu-miR-29a y el mmu-miR-29b1. Se preparó un Master Mix conteniendo 10  $\mu$ L de TaqMan Universal PCR Master Mix se añadieron los primers a una concentración de 0.5  $\mu$ M cada uno, 100 ng de cDNA y agua libre de nucleasas hasta completar un volumen final de reacción de 9  $\mu$ L.

Programar el equipo bajo las siguientes condiciones de termociclaje:

Tipo de paso	Ciclos	Temperatura (°C)	Tiempo
<b>HOLD*</b>	<b>1</b>	<b>95</b>	<b>10 min</b>
<b>PCR</b>			
<b>Desnaturalización</b>	<b>40</b>	<b>95</b>	<b>15 seg</b>
<b>Alineamiento/Extensión</b>		<b>60</b>	<b>60 seg</b>

La cuantificación de los niveles de expresión de los miRNAs 29a y 29b-1 se realizó mediante el cálculo de la expresión relativa utilizando como control endógeno (U6).

## **5.1 CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS**

La concentración de proteína se determinó por el método colorimétrico del ácido bicinconínico (BCA; Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX USA), se calculó interpolando los valores de absorbancia medidos a 570 nm en una recta, usando como solución patrón albúmina sérica bovina (BSA) con un rango de 0-1500 µg/mL. Se empleo una dilución 1:10 de las muestras en buffer de lisis, se colocaron X µL de lo anterior en una placa de 96 pocillos y se añadieron 200 µL de reactivo de trabajo BCA, obteniendo un volumen final por pozo de X µL en una relación 1:8 muestra/reactivo tal como lo indicaba el protocolo del proveedor.

## **5.2 ACTIVIDAD DE B-SECRETASA**

La determinación de la actividad de  $\beta$ -secretasa (BACE) se obtuvo mediante el Kit comercial SensoLyte® 520  $\beta$ -Secretase Assay Kit (AnaSpec, Fremont, CAL USA) de acuerdo con el protocolo del fabricante. Este ensayo se basa en la escisión en Leu-Asp de un péptido específico de  $\beta$ -secretasa para dar lugar finalmente a una señal fluorescente. La intensidad de la señal fluorimétrica es proporcional al grado de hidrólisis del sustrato peptídico, y, por tanto, a la actividad enzimática  $\beta$ -secretasa. Para ello se utilizó el lisado celular tras su exposición al tratamiento con el MeHg a las concentraciones de A, B y C µM. El ensayo de actividad enzimática se lleva a cabo en ausencia (reacción de control), y en presencia del compuesto a ensayar, en un determinado rango de concentraciones. Para cada uno de los compuestos en estudio se determinó su valor de fluorescencia emitida en ausencia del enzima, valor que se sustrajo a la señal de fluorescencia emitida de la reacción en presencia de enzima. La fluorescencia se midió tras la incubación a 37 °C durante 1 hora, utilizando un lector

de fluorescencia para placas multipocillo Synergy™ H1 (BioTek, Winooski VT USA) a una excitación de 490 nm y emisión de 520 nm.

### **5.3 ANALISIS ESTADISTICO**

Para el análisis estadístico primero se analizaron los requisitos de parametricidad: la distribución normal de los datos se pretende analizarla mediante la prueba de Shapiro Wilk y la homogeneidad de las varianzas mediante la prueba de Brown Forsythe. Los datos no paramétricos se analizaron las medianas mediante la prueba de Kruskal-Wallis, y se graficaron las medianas más menos ( $\pm$ ) los rangos Inter cuantiles.

## 6 RESULTADOS Y DISCUSION

### 6.1 ESTANDARIZACIÓN DE LAS CONDICIONES ÓPTIMAS DE CULTIVO E INTOXICACIÓN

Se seleccionó un modelo celular de origen neural que expresara de forma endógena APP por lo que se decidió utilizar una línea de neuroblastoma de ratón Neuro 2a (N2a), un modelo estudiado por nuestro grupo y ampliamente utilizado en el ámbito neurocientífico para el estudio de procesos tanto fisiológicos como patológicos. La línea N2a corresponde a células adherentes que en cultivo proliferan de manera continua exhibiendo una morfología tipo fibroblasto por lo que son de fácil manipulación y recuperación. La descongelación y mantenimiento de la línea celular se realizó en condiciones estándar de 37 °C, 95 %  $O_2$  y 5 %  $CO_2$  y atmósfera húmeda. Nuestros resultados muestran que el número de células óptimo para los experimentos es de  $X$  a  $X_1$  células por pozo, ya que en este rango se obtienen absorbancias de 0.75 – 1.25 Abs, recomendado por MTT Cell Proliferation Assay ATCC 30-1010k.

Con la finalidad de establecer el número óptimo de células que se sembrarían por pozo para los experimentos de intoxicación celular, se realizó un gradiente de número de células en una placa de 96 pocillos que iban de 0 a 20,000 células por pozo. Posteriormente, se efectuó el ensayo de viabilidad celular midiendo la absorbancia del MTT a una longitud de onda de 570 nm. Nuestros resultados muestran que el número de células óptimo para los experimentos es de  $X$  a  $X_1$  células por pozo, ya que en este rango se obtienen absorbancias de 0.75 – 1.25 Abs, como lo recomienda el inserto MTT Cell Proliferation Assay ATCC 30-1010k.

El siguiente objetivo fue el de establecer la concentración óptima de MeHg para realizar los ensayos de toxicidad celular. Basados en el trabajo de Simone y Cols. (2017) donde se exponen células de neuroblastoma N2a a MeHg, partimos de una solución madre de 4 mM de MeHg en medio DMEM completo. Se realizaron dos diluciones consecutivas para obtener concentraciones finales de A, B, C y D  $\mu$ M de MeHg en los pocillos de la placa con las células previamente cultivadas medio DMEM completo. Las células fueron incubadas durante 24 horas a 37 °C y se realizó el ensayo

de viabilidad celular por MTT. En este primer ensayo no se observó la disminución de la viabilidad celular por la exposición a MeHg. (Figura 3)

Este comportamiento obtenido se explica debido a que el MeHg presenta una afinidad muy alta por los grupos sulfhidrilo, este organometal se une en una proporción 1:1 a las moléculas de albúmina sérica (Yu-Feng Li et al. 2016). Por lo tanto, al realizar la solución madre de MeHg en medio DMEM completo, el MeHg interaccionó con el SBF y disminuyendo la fracción libre y la acción tóxica del MeHg. El problema se acentuó al realizar las diluciones subsecuentes, ya que no se observaron cambios en la viabilidad celular. Una vez establecido el problema, se decidió realizar la dilución madre de MeHg ahora en PBS 1X. Posteriormente, se realizó nuevamente el experimento de viabilidad celular por MTT en la placa de 96 pocillos, con dos condiciones diferentes; la primera utilizando MeHg preparado con medio DMEM completo a las concentraciones de A, B, C, D, E, F y G  $\mu\text{M}$ ; y la segunda con MeHg preparado en PBS 1X a concentraciones de a, b, c, d, e y f  $\mu\text{M}$ . Ambos ensayos incluyeron sus respectivos blancos. Nuestros resultados demuestran la disminución de la viabilidad celular solamente en las células expuestas a MeHg preparado en PBS 1X, por lo que los experimentos posteriores fueron realizados con estas condiciones de trabajo: un grupo de células expuestas a MeHg en presencia de SBF y otro en ausencia de SBF hasta obtener un total de 6 experimentos con diferentes pasajes. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 2 donde se observa que la exposición a c  $\mu\text{M}$  de MeHg en las células Neuro2a disminuye a un 80% la viabilidad celular en medio sin suero (\*\* $p < 0.001$ ) (FIGURA 4). Esto también pudo ser observado en las imágenes bajo microscopio, las cuales demuestran la presencia tanto de células muertas y vivas, manteniendo sus conexiones neuronales aún a la concentración de c  $\mu\text{M}$  en comparación con las células control donde la viabilidad es cercana al 100 % y las expuestas a 10  $\mu\text{M}$  donde el porcentaje de viabilidad fue del 80%(Figura 5).

## **6.2 LOS NIVELES DE MIR29A Y MIR29B SE ENCUENTRAN DISMINUIDOS EN LOS GRUPOS EXPUESTOS A METILMERCURIO.**

Con la finalidad de evaluar el efecto que ejerce el MeHg sobre la expresión de miR29a y miR29b-1, se llevó a cabo la técnica RT-qPCR a partir de las muestras de cDNA extraídas de células expuestas a a, c y d  $\mu\text{M}$  de MeHg durante 24 horas ( $n = 6$ ).

En la Figura 6 se muestra la representación gráfica de los niveles de expresión normalizada de miR-29a, donde se logra observar una diferencia estadísticamente significativa en el grupo tratado con a  $\mu\text{M}$  de MeHg con respecto al control ( $*p < 0.05$ ) observándose una disminución de la expresión del miR-29a, pero las demás concentraciones no se observan cambios por lo que no hay una relación dependiente de la concentración de MeHg.

En la Figura 7 se observa que el miRNA 29b incremento su expresión en las células tratadas con d  $\mu\text{M}$  de MeHg ( $***p = 0.0001$ ) con respecto al control negativo.

### 6.3 ANÁLISIS DE LA ACTIVIDAD DE BACE1

Para realizar el análisis de la actividad enzimática, partimos de células expuestas a MeHg bajo las mismas condiciones señaladas anteriormente. Las células fueron lisadas y se cuantificó la cantidad de proteínas mediante el método de BCA. Se realizó una curva de calibración siguiendo las indicaciones del Kit de Ensayo de Actividad SensoLyte 520 TACE (AnaSpec, Fremont, CA, EUA) la cual se muestra en la Figura 8, se muestra un coeficiente de determinación ( $r^2$ ) de 0.9983 lo que indica que la calibración es precisa ya que todos los puntos se acercan al valor real.

En la Figura 9 se muestran los resultados obtenidos de la medición de la actividad enzimática en células control, expuestas al MeHg. Podemos observar que a la concentración de  $d \mu\text{M}$  hay una disminución del efecto de BACE con una diferencia estadísticamente significativa con respecto al control ( $p < 0.0140$ ).

## 6.4 DISCUSIÓN

La acumulación extracelular de la proteína beta amiloide ( $A\beta$ ) juega un papel importante en la enfermedad de Alzheimer (EA). Algunos metales, como el mercurio, pueden incrementar la acumulación de  $A\beta$  en el cerebro, sin embargo, hasta la fecha no está claro el mecanismo por el cual este metal puede generar neurotoxicidad. El presente estudio tuvo como objetivo evaluar la expresión de miR-29a y miR-29b-1 y analizarla con la actividad de BACE1 en un modelo *in vitro* de neuronas N2a expuestas a metilmercurio con la finalidad de establecer un probable mecanismo en los procesos neurodegenerativos relacionados con el desarrollo de la EA. Esta investigación representa la primera evidencia de los efectos de la exposición a MeHg en la actividad de  $\beta$ -secretasa a través de la alteración en la expresión de miRNAs 29a/b-1 en un modelo *in vitro*, apoyando la hipótesis que sugiere que el MeHg podría estar involucrado en el desarrollo de enfermedades neurodegenerativas, específicamente, con la enfermedad de Alzheimer.

De acuerdo con el conocimiento generado hasta el momento, se ha propuesto que el mecanismo de toxicidad del mercurio se debe principalmente a su alta afinidad por los grupos sulfhidrilo, como lo demuestran nuestros resultados obtenidos en el ensayo de viabilidad celular donde, en un principio, no se observó ningún efecto tóxico en las células cultivadas con el MeHg y medio DMEM completo ya que se pudo deducir que el MeHg se estaba uniendo a las moléculas de albúmina. Las interacciones moleculares con los grupos sulfhidrilo en las moléculas de albúmina, metalotioneína, glutatión y cisteína se han implicado en los mecanismos relacionados con la captación, acumulación, transporte y toxicidad de los iones de mercurio (Y. Li, 2016). Sin embargo, hasta la fecha, los mecanismos que explican la toxicidad del mercurio no han sido completamente dilucidados, especialmente aquellos relacionados con los efectos neurotóxicos.

Se ha reportado que el MeHg tiene un efecto importante en la generación A $\beta$  insoluble a través de la inducción de estrés oxidativo y la generación de neurotoxicidad. El proceso de precipitación de A $\beta$  juega un papel importante en la patogénesis de la EA (Monnet-Tschudi, 2006; Salinaro, 2018); éste se genera por la escisión de la proteína precursora amiloide (APP) por la  $\beta$ -secretasa (BACE1). Existen diversos candidatos como moduladores de la actividad de las secretasas, incluyendo a los miRNAs, donde se sabe que la familia miR29 (29a y 29b-1) se dirigen a sitios de unión conservados dentro del 3' UTR de BACE1 y la ausencia de estos miRNAs pueden conducir en un aumento en la producción de A $\beta$  en el cultivo celular (Hébert, 2008). En el presente estudio, en el ensayo RT-qPCR de miRNA obtuvimos un aumento de la expresión del miR29b-1 ( $p < 0.0001$ ) con respecto a la concentración de  $d \mu\text{M}$  de MeHg, mostrando que existe una relación dosis dependiente de la expresión de miRNA29b-1 y la dosis de MeHg administrado. Por otro lado, los niveles de expresión de miRNA29a se mantienen a las diferentes dosis de MeHg administradas, por lo que no existe una relación dosis dependiente con el MeHg. Esto es similar a lo encontrado con otros estudios como los de Tuğba y Hümeýra (2021) los cuales encuentran correlaciones positivas significativas entre el mercurio sérico y los niveles plasmáticos de los miRNA 125-5p y 127-3p en un grupo de pacientes con amalgamas dentales. En el estudio de Ding (2016) el ensayo de micromatrices de miRNA revelaron que miR-92a y miR-486 se asociaron positivamente con los trabajadores expuestas al mercurio. Ellos explican que el miR-486 puede suprimir directamente reguladores negativos del factor nuclear- $\kappa\text{B}$  (NF- $\kappa\text{B}$ ), induciendo una continua activación de la vía de señalización de NF- $\kappa\text{B}$  y dar como resultado la expresión inducida de COX-2 e iNOS dando lugar a enfermedades inflamatorias. La enzima BACE-1, al hacer la escisión de la APP para generar A $\beta$ , estimula el factor NF- $\kappa\text{B}$  que conduce a la secreción de citocinas inflamatorias (Li y Wang, 2018).

Resultados de Geng *et al.* (2018) muestran cómo algunos miRNA pueden activar PPAR-gamma, lo que también conduce a la activación de NF- $\kappa$ B, lo que conduce a la liberación de citocinas y la producción de A $\beta$ .

BACE1 puede ser un objetivo importante en la neurotoxicidad similar a la EA inducida por neurotóxicos ambientales como metales, pesticidas, y compuestos sintéticos. Los neurotóxicos ambientales aumentan la expresión y actividad de BACE1 al inducir estrés mitocondrial, estrés oxidativo o por interacción directa (T. Sai, 2021). El estrés oxidativo inducido por neurotóxicos ambientales puede aumentar la transcripción y traducción de BACE1 o inducir la redistribución de BACE1 para aumentar el procesamiento amiloidogénico de APP y aumentar la producción de beta amiloide. En el presente estudio se obtuvo una disminución de la actividad de BACE1 (\* $p < 0.0140$ ) a la concentración de  $d \mu\text{M}$  y que probablemente se puede relacionar con un incremento en la expresión del miR29b1 a la misma concentración, Algo similar se ha reportado por Pereira *y col.* (2016), en donde muestran que la sobreexpresión de un pre-miR-29b recombinante induce una marcada disminución en los niveles de la proteína BACE1 y, en consecuencia, una disminución significativa en el nivel del A $\beta$  42 endógeno. No se conoce hasta el momento cual es mecanismo involucrado, pero se sabe que BACE1 es una glicoproteína de membrana integral de tipo I. Se conocen diversas modificaciones postraduccionales en BACE1, incluida la fosforilación de una serina en el dominio citoplasmático, la inclusión de cuatro sitios de glicosilación en el dominio catalítico y otro proceso involucrado en la maduración de BACE1, que implica la formación de enlaces disulfuro dentro del dominio catalítico (Venugopal, 2008), por lo que suponemos que el MeHg al tener una alta afinidad por los grupos sulfhidrilo podría estar ejerciendo una fuerte acción inhibitoria sobre la actividad enzimática de BACE1. Por otro lado, Kim *y Cols.* (2014) sugieren que la acumulación de A $\beta$  en el cerebro puede ser explicada por la alteración en los mecanismos de aclaramiento del péptido, de tal forma que el transportador de eflujo LRP-1 disminuye sus niveles, mientras que el transportador de influjo para A $\beta$ , RAGE, se incrementa en ratas

expuestas a mercurio. Además, sus resultados demuestran cambios dependientes del tiempo en los niveles de A $\beta$  en las diferentes regiones del cerebro.

Aunque con los resultados obtenidos en el trabajo no se puede dilucidar un mecanismo que ejerce el MeHg sobre los mecanismos neurotóxicos asociados con la enfermedad de Alzheimer, futuras investigaciones pueden ser enfocadas al estudio de la inhibición de miRNA29b-1 que permitan asociar este miRNA con la disminución de la actividad enzimática de BACE1 en presencia de MeHg, Los estudios *in vivo* e *in vitro* también informan ARNm de BACE1 normal y elevado junto con una mayor expresión y/o actividad de la proteína en la exposición a neurotóxicos ambientales (T. Sai, 2021). Sin embargo, también existen inconsistencias en la medición de BACE1; algunos estudios solo analizan la expresión de mRNA o proteína y/o la actividad enzimática. Medir el ARNm, la expresión de proteínas, la actividad y la vía de degradación de BACE1 ayudará a comprender mejor el mecanismo asociado con la alteración de BACE1. Estudios publicados por Hébert *et al.* (2008) y Pererira *et al* (2016) sugieren la participación de mecanismos post-traducionales ya que estudios anteriores han encontrado que el nivel de expresión de ARNm de BACE1 no cambió después de la exposición de MeHg y la expresión de neprilisina (NEP) proteasa que degrada A $\beta$  al disminuyó drásticamente (Song JW y Choi BS, 2013). Además, es necesario evaluar si la disminución de la actividad de BACE1 se debe a un mecanismo directo de interacción proteína y MeHg dado por la interacción entre MeHg y los grupos sulfhidrilo en el sitio catalítico de BACE.

## 7 CONCLUSIÓN

La exposición a MeHg provoca un aumento la expresión de miR29b-1 en los grupos expuestos comparados con el control y una disminución en la expresión de miR-29a. La exposición de las células Neuro2a a MeHg disminuye la actividad de BACE1 de manera dosis dependiente. Esta investigación representa la primera evidencia de los efectos de la exposición a MeHg sobre actividad de  $\beta$ -secretasa, probablemente a través de la alteración en la expresión de miRNAs 29a/b-1 en un modelo *in vitro*, apoyando la hipótesis que sugiere que el MeHg podría estar involucrado en el desarrollo de enfermedades neurodegenerativas, específicamente, con la enfermedad de Alzheimer.

## 8 BIBLIOGRAFÍA

- Aaseth, J., Alexander, J., Bjørklund, G., Hestad, K., Dusek, P., Roos, P. M., & Alehagen, U. (2016). Treatment strategies in Alzheimer's disease: a review with focus on selenium supplementation. *BioMetals*, 29(5), 827–839. <https://doi.org/10.1007/s10534-016-9959-8>
- Amakiri, N., Kubosumi, A., Tran, J., & Reddy, P. H. (2019). Amyloid beta and micrnas in Alzheimer's disease. *Frontiers in Neuroscience*, 13(2), 1–10. <https://doi.org/10.3389/fnins.2019.00430>
- Ambros, V. (2003). MicroRNA pathways in flies and worms: Growth, death, fat, stress, and timing. *Cell*, 113(6), 673–676. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(03\)00428-8](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(03)00428-8)
- Azar, J., Yousef, M. H., El-Fawal, H. A. N., & Abdelnaser, A. (2021). Mercury and Alzheimer's disease: a look at the links and evidence. *Metabolic Brain Disease*, 36(3), 361–374. <https://doi.org/10.1007/s11011-020-00649-5>
- Basha, M. R., Wei, W., Bakheet, S. A., Benitez, N., Siddiqi, H. K., Ge, Y. W., Lahiri, D. K., & Zawia, N. H. (2005). The fetal basis of amyloidogenesis: Exposure to lead and latent overexpression of amyloid precursor protein and  $\beta$ -amyloid in the aging brain. *Journal of Neuroscience*, 25(4), 823–829. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4335-04.2005>
- Bellingham, S. A., Guo, B. B., Coleman, B. M., & Hill, A. F. (2012). Exosomes: Vehicles for the transfer of toxic proteins associated with neurodegenerative diseases? *Frontiers in Physiology*, 3, (1)12. <https://doi.org/10.3389/fphys.2012.00124>
- Bjørklund, G., Crisponi, G., Nurchi, V. M., Cappai, R., Djordjevic, A. B., & Aaseth, J. (2019). A review on coordination properties of thiol-containing chelating agents

towards mercury, cadmium, and lead. *Molecules*, 24(18), 1–32. <https://doi.org/10.3390/molecules24183247>

Bjørklund, G., Tinkov, A. A., Dadar, M., Rahman, M. M., Chirumbolo, S., Skalny, A. V., Skalnaya, M. G., Haley, B. E., Ajsuvakova, O. P., & Aaseth, J. (2019). Insights into the Potential Role of Mercury in Alzheimer's Disease. *Journal of Molecular Neuroscience*, 5(3), 12–23. <https://doi.org/10.1007/s12031-019-01274-3>

Blennow, K., de Leon, M. J., & Zetterberg, H. (2006). Alzheimer's disease. *Lancet*, 368(9533), 387–403. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(06\)69113-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(06)69113-7)

Cai, H., Wang, Y., McCarthy, D., Wen, H., Borchelt, D. R., Price, D. L., & Wong, P. C. (2001). BACE1 is the major  $\beta$ -secretase for generation of A $\beta$  peptides by neurons. *Nature Neuroscience*, 4(3), 233–234. <https://doi.org/10.1038/85064>

Cariccio, V. L., Samà, A., Bramanti, P., & Mazzon, E. (2019). Mercury Involvement in Neuronal Damage and in Neurodegenerative Diseases. *Biological Trace Element Research*, 187(2), 341–356. <https://doi.org/10.1007/s12011-018-1380-4>

Comisión para la cooperación Ambiental Castro Díaz, J. *Evaluación de los suministros de mercurio primario y secundario en México*. (2013) 110, recuperado de <http://www.cec.org/es/publications/evaluacion-de-los-suministros-de-mercurio-primario-y-secundario-en-mexico/>

Comisión para la cooperación Ambiental Castro Díaz, J. Castro, J. D. *Informe sobre el mercado del mercurio en México*. (2011), 12–14. recuperado de [www.cec.org](http://www.cec.org)

Chen, F. Z., Zhao, Y., & Chen, H. Z. (2019). MicroRNA-98 reduces amyloid  $\beta$ -protein production and improves oxidative stress and mitochondrial dysfunction through the Notch signaling pathway via HEY2 in Alzheimer's disease mice. *International Journal of Molecular Medicine*, 43(1), 91–102. <https://doi.org/10.3892/ijmm.2018.3957>

- Clarkson, T. W., Vyas, J. B., & Ballatori, N. (2007). Mechanisms of mercury disposition in the body. *American Journal of Industrial Medicine*, *50*(10), 757–764. <https://doi.org/10.1002/ajim.20476>
- Cole, S. L., & Vassar, R. (2007). The Alzheimer's disease  $\beta$ -secretase enzyme, BACE1. *Molecular Neurodegeneration*, *2*(1), 1–25. <https://doi.org/10.1186/1750-1326-2-22>
- Cuellar, T. L., Davis, T. H., Nelson, P. T., Loeb, G. B., Harfe, B. D., Ullian, E., & McManus, M. T. (2008). Dicer loss in striatal neurons produces behavioral and neuroanatomical phenotypes in the absence of neurodegeneration. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *105*(14), 5614–5619. <https://doi.org/10.1073/pnas.0801689105>
- Danbolt, N. C. (2001). Glutamate uptake. *Progress in Neurobiology*, *65*(1), 1–105. [https://doi.org/10.1016/S0301-0082\(00\)00067-8](https://doi.org/10.1016/S0301-0082(00)00067-8)
- Deng, Y., Ding, Y., & Hou, D. (2014). Research status of the regulation of miRNA on BACE1. *International Journal of Neuroscience*, *124*(7), 474–477. <https://doi.org/10.3109/00207454.2013.858249>
- Ding, E., Guo, J., Bai, Y., Zhang, H., Liu, X., Cai, W., Zhong, L., & Zhu, B. (2017). MiR-92a and miR-486 are potential diagnostic biomarkers for mercury poisoning and jointly sustain NF- $\kappa$ B activity in mercury toxicity. *Scientific Reports*, *7*(1), 1–10. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-13230-5>
- Ding, E., Zhao, Q., Bai, Y., Xu, M., Pan, L., Liu, Q., Wang, B., Song, X., Wang, J., Chen, L., & Zhu, B. (2016). Plasma microRNAs expression profile in female workers occupationally exposed to mercury. *Journal of Thoracic Disease*, *8*(5), 833–841. <https://doi.org/10.21037/jtd.2016.03.36>

- Elbashir, S. M., Lendeckel, W., & Tuschl, T. (2001). RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs. *Genes and Development*, 15(2), 188–200. <https://doi.org/10.1101/gad.862301>
- Farina, M., Rocha, J. B. T., & Aschner, M. (2011). Mechanisms of methylmercury-induced neurotoxicity: Evidence from experimental studies. *Life Sciences*, 89(15–16), 555–563. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2011.05.019>
- Feng, M. G., Liu, C. F., Chen, L., Feng, W. B., Liu, M., Hai, H., & Lu, J. M. (2018). MiR-21 attenuates apoptosis-triggered by amyloid- $\beta$  via modulating PDCD4/PI3K/AKT/GSK-3 $\beta$  pathway in SH-SY5Y cells. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 101(8), 1003–1007. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.02.043>
- Findeis, M. A. (2007). The role of amyloid  $\beta$  peptide 42 in Alzheimer's disease. *Pharmacology and Therapeutics*, 116(2), 266–286. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2007.06.006>
- Geekiyanaige, H., & Chan, C. (2011). Micro RNA-137/181c regulates serine palmitoyltransferase and in turn amyloid  $\beta$  novel targets in sporadic Alzheimer's disease. *Journal of Neuroscience*, 31(41), 14820–14830. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3883-11.2011>
- Geng, L., Zhang, T., Liu, W., & Chen, Y. (2018). Inhibition of miR-128 abates A $\beta$ -mediated cytotoxicity by targeting PPAR- $\gamma$  via NF- $\kappa$ B inactivation in primary mouse cortical neurons and neuro2a cells. *Yonsei Medical Journal*, 59(9), 1096–1106. <https://doi.org/10.3349/ymj.2018.59.9.1096>
- Girek, M., Szymanski, P. (2019). Tacrine hybrids as multi-target-directed ligands in Alzheimer's disease: influence of chemical structures on biological activities. *Chemical Papers* 73(3), 269-289. <https://doi.org/10.1007/s11696-018-0590-8>

- Hébert, S. S., & De Strooper, B. (2009). Alterations of the microRNA network cause neurodegenerative disease. *Trends in Neurosciences*, 32(4), 199–206. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2008.12.003>
- Hébert, S. S., Horré, K., Nicolaï, L., Papadopoulou, A. S., Mandemakers, W., Silaharoglu, A. N., Kauppinen, S., Delacourte, A., & De Strooper, B. (2008). Loss of microRNA cluster miR-29a/b-1 in sporadic Alzheimer's disease correlates with increased BACE1/ $\beta$ -secretase expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(17), 6415–6420. <https://doi.org/10.1073/pnas.0710263105>
- Higaki, S., Muramatsu, M., Matsuda, A., Matsumoto, K., Satoh, J. ichi, Michikawa, M., & Niida, S. (2018). Defensive effect of microRNA-200b/c against amyloid-beta peptide-induced toxicity in Alzheimer's disease models. *PLoS ONE*, 13(5), 1–18. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0196929>
- Jia, H., Osak, M., Bogu, G. K., Stanton, L. W., Johnson, R., & Lipovich, L. (2010). Genome-wide computational identification and manual annotation of human long noncoding RNA genes. *Rna*, 16(8), 1478–1487. <https://doi.org/10.1261/rna.1951310>
- Kole, A. J., Swahari, V., Hammond, S. M., & Deshmukh, M. (2011). miR-29b is activated during neuronal maturation and targets BH3-only genes to restrict apoptosis. *Genes and Development*, 25(2), 125–130. <https://doi.org/10.1101/gad.1975411>
- Kopan, R., & Ilagan, M. X. G. (2004).  $\gamma$ -Secretase: Proteasome of the membrane? *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 5(6), 499–504. <https://doi.org/10.1038/nrm1406>

- Kotilinek, L. A., Bacskai, B., Westerman, M., Kawarabayashi, T., Younkin, L., Hyman, B. T., Younkin, S., & Ashe, K. H. (2002). Reversible memory loss in a mouse transgenic model of Alzheimer's disease. *Journal of Neuroscience*, *22*(15), 6331–6335. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.22-15-06331.2002>
- Kriegel, A. J., Liu, Y., Fang, Y., Ding, X., & Liang, M. (2012). The miR-29 family: Genomics, cell biology, and relevance to renal and cardiovascular injury. *Physiological Genomics*, *44*(4), 237–244. <https://doi.org/10.1152/physiolgenomics.00141.2011>
- Kriegel, A. J., Liu, Y., Fang, Y., Ding, X., & Liang, M. (2012). The miR-29 family: Genomics, cell biology, and relevance to renal and cardiovascular injury. *Physiological Genomics*, *44*(4), 237–244. <https://doi.org/10.1152/physiolgenomics.00141.2011>
- Lagos-Quintana, M., Rauhut, R., Lendeckel, W., & Tuschl, T. (2001). Identification of novel genes coding for small expressed RNAs. *Science*, *294*(5543), 853–858. <https://doi.org/10.1126/science.1064921>
- Lei, X., Lei, L., Zhang, Z., Zhang, Z., & Cheng, Y. (2015). Downregulated miR-29c correlates with increased BACE1 expression in sporadic Alzheimer's disease. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*, *8*(2), 1565–1574.
- Li, J., & Wang, H. (2018). MiR-15b reduces amyloid- $\beta$  accumulation in SH-SY5Y cell line through targeting NF- $\kappa$ B signaling and BACE1. *Bioscience Reports*, *38*(6), 1–10. <https://doi.org/10.1042/BSR20180051>
- Li, Q., Kappil, M. A., Li, A., Dassanayake, P. S., Darrah, T. H., Friedman, A. E., Friedman, M., Lambertini, L., Landrigan, P., Stodgell, C. J., Xia, Y., Nanes, J. A., Aagaard, K. M., Schadt, E. E., Murray, J. C., Clark, E. B., Dole, N., Culhane, J., Swanson, J., ... Chen, J. (2015). Exploring the associations between microRNA expression profiles and environmental pollutants in human placenta from the

- National Children's Study (NCS). *Epigenetics*, 10(9), 793–802. <https://doi.org/10.1080/15592294.2015.1066960>
- Li, Y., Fan, Y., Zhao, J., Xu, X., Jing, H., Shang, L., Gao, Y., Li, B., & Li, Y. F. (2016). Elevated mercury bound to serum proteins in methylmercury poisoned rats after selenium treatment. *BioMetals*, 29(5), 893–903. <https://doi.org/10.1007/s10534-016-9961-1>
- Lin, R., Chen, X., Li, W., Han, Y., Liu, P., & Pi, R. (2008). Exposure to metal ions regulates mRNA levels of APP and BACE1 in PC12 cells: Blockage by curcumin. *Neuroscience Letters*, 440(3), 344–347. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2008.05.070>
- Long, J. M., Maloney, B., Rogers, J. T., & Lahiri, D. K. (2019). Novel upregulation of amyloid- $\beta$  precursor protein (APP) by microRNA-346 via targeting of APP mRNA 5'-untranslated region: Implications in Alzheimer's disease. *Molecular Psychiatry*, 24(3), 345–363. <https://doi.org/10.1038/s41380-018-0266-3>
- MA, T., Sun, X., Sun, S., Guo, R., & MA, X. (2016). The study of peripheral blood miR-29a/101 in the diagnosis of Alzheimer's disease. *Chinese Journal of Behavioral Medicine and Brain Science*, (12), 1010-1014. [10.3760/cma.j.issn.1674-6554.2016.11.011](https://doi.org/10.3760/cma.j.issn.1674-6554.2016.11.011)
- Magos, L., & Clarkson, T. W. (2006). Overview of the clinical toxicity of mercury. *Annals of Clinical Biochemistry*, 43(4), 257–268. <https://doi.org/10.1258/000456306777695654>
- Menéndez-González, M., Pérez-Pinera, P., Martínez-Rivera, M., Calatayud, M. T., & Blázquez Menes, B. (2006). APP processing and the APP-KPI domain involvement in the amyloid cascade. *Neurodegenerative Diseases*, 2(6), 277–283. <https://doi.org/10.1159/000092315>

Servicio geológico Mexicano, M., Mario, L., & Cantú, A. *Anuario Estadístico de la Minería Mexicana no. 46, edición, 2016, Secretaría de Minería*, recuperado de [https://www.sgm.gob.mx/productos/pdf/Anuario\\_2016\\_Edicion\\_2017](https://www.sgm.gob.mx/productos/pdf/Anuario_2016_Edicion_2017).

Servicio geológico Mexicano, M., Mario, L., & Cantú, A. *Anuario Estadístico de la Minería Mexicana no. 49, edición, 2019, Secretaría de Minería*, recuperado de [https://www.sgm.gob.mx/productos/pdf/Anuario\\_2019\\_Edicion\\_2020](https://www.sgm.gob.mx/productos/pdf/Anuario_2019_Edicion_2020)

Monnet-Tschudi, F., Zurich, M. G., Boschat, C., Corbaz, A., & Honegger, P. (2006). Involvement of environmental mercury and lead in the etiology of neurodegenerative diseases. *Reviews on Environmental Health*, 21(2), 105–117. <https://doi.org/10.1515/REVEH.2006.21.2.105>

Monnet-Tschudi, F., Zurich, M. G., Boschat, C., Corbaz, A., & Honegger, P. (2006). Involvement of environmental mercury and lead in the etiology of neurodegenerative diseases. *Reviews on Environmental Health*, 21(2), 105–117. <https://doi.org/10.1515/REVEH.2006.21.2.105>

Mutter, J., Curth, A., Naumann, J., Deth, R., & Walach, H. (2010). Does inorganic mercury play a role in Alzheimer's disease? A systematic review and an integrated molecular mechanism. *Journal of Alzheimer's Disease*, 22(2), 357–374. <https://doi.org/10.3233/JAD-2010-100705>

\*NOM-127-SSA1, N. oficial M. (1994). *Salud Ambiental, Agua para uso y Consumo Humano-Limites permisibles de calidad y tratamientos a que debe someterse el agua para su potabilización. Diario Oficial de la Federación*.

Olivieri, G., Brack, C., Müller-Spahn, F., Stähelin, H. B., Herrmann, M., Renard, P., Brockhaus, M., & Hock, C. (2000). Mercury induces cell cytotoxicity and oxidative stress and increases  $\beta$ - amyloid secretion and tau phosphorylation in SHSY5Y neuroblastoma cells. *Journal of Neurochemistry*, 74(1), 231–236. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.2000.0740231.x>

- Olivieri, G., Brack, C., Müller-Spahn, F., Stähelin, H. B., Herrmann, M., Renard, P., Brockhaus, M., & Hock, C. (2000). Mercury induces cell cytotoxicity and oxidative stress and increases  $\beta$ - amyloid secretion and tau phosphorylation in SHSY5Y neuroblastoma cells. *Journal of Neurochemistry*, 74(1), 231–236. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.2000.0740231.x>
- Pallocca, G., Fabbri, M., Sacco, M. G., Gribaldo, L., Pamies, D., Laurenza, I., & Bal-Price, A. (2013). MiRNA expression profiling in a human stem cell-based model as a tool for developmental neurotoxicity testing. *Cell Biology and Toxicology*, 29(4), 239–257. <https://doi.org/10.1007/s10565-013-9250-5>
- Pasquinelli, A. E., Reinhart, B. J., Slack, F., Martindale, M. Q., Kuroda, M. I., Maller, B., Hayward, D. C., Ball, E. E., Degnan, B., Müller, P., Spring, J., Srinivasan, A., Fishman, M., Finnerty, J., Corbo, J., Levine, M., Leahy, P., Davidson, E., & Ruvkun, G. (2000). Conservation of the sequence and temporal expression of let-7 heterochronic regulatory RNA. *Nature*, 408(6808), 86–89. <https://doi.org/10.1038/35040556>
- Pereira, P. A., Tomás, J. F., Queiroz, J. A., Figueiras, A. R., & Sousa, F. (2016). Recombinant pre-miR-29b for Alzheimer's disease therapeutics. *Scientific Reports*, 6(November 2015), 1–11. <https://doi.org/10.1038/srep19946>
- Ray, P. D., Yosim, A., & Fry, R. C. (2014). Incorporating epigenetic data into the risk assessment process for the toxic metals arsenic, cadmium, chromium, lead, and mercury: Strategies and challenges. *Frontiers in Genetics*, (5), 1–26. <https://doi.org/10.3389/fgene.2014.00201>
- Reinhart BJ, Bartel DP. (2002). Small RNAs correspond to centromere heterochromatic repeats. *Science* 13;297(5588):1831. doi: 10.1126/science.1077183

- Roshan, R., Ghosh, T., Gadgil, M., & Pillai, B. (2012). Regulation of BACE1 by miR-29a/b in a cellular model of spinocerebellar ataxia 17. *RNA Biology*, 9(6), 891–899. <https://doi.org/10.4161/rna.19876>
- Rossi, L., Arciello, M., Capo, C., & Rotilio, G. (2006). Copper imbalance and oxidative stress in neurodegeneration. *The Italian journal of biochemistry*, 55(3-4), 212–221.
- Routhier A, Astuccio M, Lahey D, Monfredo N, Johnson A, Callahan W, Partington A, Fellows K, Ouellette L, Zhidro S, Goodrow C, Smith A, Sullivan K, Simone P, Le L, Vezuli B, Zohni M, West E, Gleason D, ... Bryan, B. (2010). Pharmacological inhibition of Rho-kinase signaling with Y-27632 blocks melanoma tumor growth. *Oncology Reports*, 23(3), 861–867. <https://doi.org/10.3892/or>
- Schonrock, N., Matamales, M., Ittner, L. M., & Götz, J. (2012). MicroRNA networks surrounding APP and amyloid- $\beta$  metabolism — Implications for Alzheimer ' s disease. *Experimental Neurology*, 235(2), 447–454. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2011.11.013>
- Shioya, M., Obayashi, S., Tabunoki, H., Arima, K., Saito, Y., Ishida, T., & Satoh, J. (2010). Aberrant microRNA expression in the brains of neurodegenerative diseases: MiR-29a decreased in Alzheimer disease brains targets neurone navigator 3. *Neuropathology and Applied Neurobiology*, 36(4), 320–330. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2990.2010.01076>
- Sirois, J. E., & Atchison, W. D. (2000). Methylmercury affects multiple subtypes of calcium channels in rat cerebellar granule cells. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 167(1), 1–11. <https://doi.org/10.1006/taap.2000.8967>
- Sisodia, S. S. (1992).  $\beta$ -Amyloid precursor protein cleavage by a membrane-bound protease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 89(13), 6075–6079. <https://doi.org/10.1073/pnas.89.13.6075>

- Smirnova, L., Gräfe, A., Seiler, A., Schumacher, S., Nitsch, R., & Wulczyn, F. G. (2005). Regulation of miRNA expression during neural cell specification. *European Journal of Neuroscience*, 21(6), 1469–1477. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2005.03978.x>
- Smith, P., Al Hashimi, A., Girard, J., Delay, C., & Hébert, S. S. (2011). In vivo regulation of amyloid precursor protein neuronal splicing by microRNAs. *Journal of Neurochemistry*, 116(2), 240–247. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2010.07097.x>
- Song, J. W., & Choi, B. S. (2013). Mercury induced the accumulation of amyloid beta (A $\beta$ ) in PC12 cells: The role of production and degradation of A $\beta$ . *Toxicological Research*, 29(4), 235–240. <https://doi.org/10.5487/TR.2013.29.4.235>
- Statistics., N. C. for H., & Health. (2018). *National Center for Health Statistics. Health.*
- Trovato Salinaro, A., Pennisi, M., Di Paola, R., Scuto, M., Crupi, R., Cambria, M. T., Ontario, M. L., Tomasello, M., Uva, M., Maiolino, L., Calabrese, E. J., Cuzzocrea, S., & Calabrese, V. (2018). Neuroinflammation and neurohormesis in the pathogenesis of Alzheimer's disease and Alzheimer-linked pathologies: Modulation by nutritional mushrooms. *Immunity and Ageing*, 15(1), 1–8. <https://doi.org/10.1186/s12979-017-0108-1>
- Tsai, S.-R., Sweatt, S.K, G., B.A, C., A.Y, L., & Y, Li, L. (2016). 乳鼠心肌提取 HHS Public Access. *Physiology & Behavior*, 176(1), 139–148. <https://doi.org/10.1002/jbt.22694>.Environmental
- TUNCDEMIR, M. T., & YERLİKAYA, F. H. (2021). The Relationship Between Plasma MicroRNAs and Serum Mercury Levels in Patients with Amalgam Filling and Dentists. *Selcuk Dental Journal*, 743, 736–743. <https://doi.org/10.15311/selcukdentj.800489>

- Turner, A., & Simmonds, L. (2006). Elemental concentrations and metal bioaccessibility in UK household dust. *Science of the Total Environment*, 371(1–3), 74–81. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2006.08.011>
- Venugopal, C., Demos, C., Jagannatha Rao, K., Pappolla, M., & Sambamurti, K. (2008). Beta-Secretase: Structure, Function, and Evolution. *CNS & Neurological Disorders - Drug Targets*, 7(3), 278–294. <https://doi.org/10.2174/187152708784936626>
- Vetrivel, K. S., & Thinakaran, G. (2006). Amyloidogenic processing of  $\beta$ -amyloid precursor protein in intracellular compartments. *Neurology*, 66(2 SUPPL. 1). <https://doi.org/10.1212/01.wnl.0000192107.17175.39>
- Wallace, D. R., Taalab, Y. M., Heinze, S., Lovakovi, B. T., Pizent, A., Renieri, E., Tsatsakis, A., & Farooqi, A. A. (2020). *Toxic-Metal-Induced Alteration in miRNA Expression*.
- Wu, J., Basha, M. R., Brock, B., Cox, D. P., Cardozo-Pelaez, F., McPherson, C. A., Harry, J., Rice, D. C., Maloney, B., Chen, D., Lahiri, D. K., & Zawia, N. H. (2008). Alzheimer's Disease (AD)-like pathology in aged monkeys after infantile exposure to environmental metal lead (Pb): Evidence for a developmental origin and environmental link for AD. *Journal of Neuroscience*, 28(1), 3–9. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4405-07.2008>
- Y, D. E. L. C. D. E. M., Ayala-perez, C., Herrera-solorio, J., Garcia-camino, B., & Romero-zepeda, H. (2020). *Mercury Mining , Effects of the Minamata Convention and Its Repercussion on the Best. 1*.
- Yarto, M. (2013). *Almacenamiento Y Disposición De Mercurio en México (SEMARNAT)*.

- Yilmaz, F. M., Yilmaz, H., Tutkun, E., Uysal, S., Carman, K. B., Ilber, D., & Ercan, M. (2014). Serum biochemical markers of central nerve system damage in children with acute elemental mercury intoxication. *Clinical Toxicology*, *52*(1), 32–38. <https://doi.org/10.3109/15563650.2013.860986>
- Zeng, T., Ni, H., Yu, Y., Zhang, M., Wu, M., Wang, Q., Wang, L., Xu, S., Xu, Z., Xu, C., Xiong, J., Jiang, J., Luo, Y., Wang, Y., & Liu, H. (2019). BACE1-AS prevents BACE1 mRNA degradation through the sequestration of BACE1-targeting miRNAs. *Journal of Chemical Neuroanatomy*, *98*(January), 87–96. <https://doi.org/10.1016/j.jchemneu.2019.04.001>
- Zhang, J., Wang, X., Vikash, V., Ye, Q., Wu, D., Liu, Y., & Dong, W. (2016). ROS and ROS-Mediated Cellular Signaling. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, *2016*(Figure 1). <https://doi.org/10.1155/2016/4350965>
- Zhang, Y. W., Thompson, R., Zhang, H., & Xu, H. (2011). APP processing in Alzheimer's disease. *Molecular Brain*, *4*(1), 1–13. <https://doi.org/10.1186/1756-6606-4-3>
- Zong, Y., Wang, H., Dong, W., Quan, X., Zhu, H., Xu, Y., Huang, L., Ma, C., & Qin, C. (2011). miR-29c regulates BACE1 protein expression. *Brain Research*, *1395*, 108–115. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2011.04.035>

## 9 ANEXOS

### 9.1 ANTECEDENTES

**FIGURA 1.** Dibujo esquemático de la proteína precursora amiloide (APP) y sus vías de procesamiento (Tomado de: Schonrock et al., 2012).

**FIGURA 2.** Secuencias maduras y transcripciones primarias de la familia miR-29. Las secuencias maduras de los miembros de la familia miR-29 se conservan en humanos (hsa-), ratón (mmu-) y rata (rno-), y comparten regiones de semillas idénticas. Los nucleótidos que difieren entre los miembros de la familia miR-29 se muestran en rojo (Kriegel et al., 2012).

### 9.2 MATERIALES Y METODOS

**Tabla 1. Concentración del cDNA de las muestras U6 obtenidas de cultivo celular N2a.**

**Tabla 2. Concentración del cDNA de las muestras miR29-a obtenidas de cultivo celular N2a.**

**Tabla 3. Concentración del cDNA de las muestras miR29-b1 obtenidas de cultivo celular N2a.**

### 9.3 RESULTADOS

**FIGURA 3.** La exposición a metilmercurio (MeHg) sobre las células N2a en medio DMEM completo con SBF no disminuyó el porcentaje de viabilidad celular normalizadas respecto al control. (n=2).

**FIGURA 4.** La exposición a  $c \mu\text{M}$  de MeHg en células Neuro2a disminuye a un 80% la viabilidad según la nom ISO10993-5 celular en medio sin suero con respecto al control (n=6) (\*p=0.05, \*\*\*p=0.001).

**FIGURA 5.** Células Neuro 2a en cultivo obtenidas con una amplificación de 20X por microscopía de campo claro. Los tratamientos control, c  $\mu\text{M}$  MeHg y E  $\mu\text{M}$  MeHg fueron aplicados durante 24h

**FIGURA 6. Efecto de la exposición a metilmercurio (MeHg) sobre la expresión del miR29a.** Las gráficas representan la mediana  $\pm$  IQR ( $*p < 0.05$ ) (Kruskal-Wallis post hoc Dunn's) de los niveles de RNAm **miR29a** en el modelo celular *in vitro* N2a (n = 3-4 por grupo). Todos los valores fueron normalizados con respecto a la expresión del control endógeno U6.

**FIGURA 7. Efecto de la exposición a metilmercurio (MeHg) sobre la expresión del miR29b1** Las gráficas representan la mediana  $\pm$  IQR ( $*p < 0.0001$ ) (Kruskal-Wallis post hoc Dunn's) de los niveles de RNAm **miR29b1** en el modelo celular *in vitro* N2a (n = 3-4 por grupo). Todos los valores fueron normalizados con respecto a la expresión del control endógeno U6.

**FIGURA 8. Curva de calibración de proteínas con 5 puntos de concentración estándar.**

**FIGURA 9. Modificación de la expresión de BACE por la exposición a MeHg las células N2a.** Los resultados se muestran como representación gráfica y se expresan como porcentaje de cambio respecto al grupo control, media  $\pm$  DE. (n=6) ( $*p < 0.0140$ ).

